UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Examiner:

Unknown

Art Unit:

Unknown

Re:

Application of:

CITERNESI, Ugo Raffaello

Serial No.:

To be assigned

Filed:

herewith

For:

COSMETIC OR PHARMACEUTICAL
COMPOSITION FOR TOPICAL USE TO
PREVENT OR DIFFER ANDROGENETIC

ALOPECIA

LETTER REGARDING PRIORITY

Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, VA 22313-1450 February 27, 2004

Sir:

Applicant hereby claims the benefit of priority from Italian Patent Application No.

MI2003A000369 filed on February 28, 2003. A certified copy of this application is attached hereto.

Respectfully submitted,

MUSERLIAN, LUCAS & MERCANTI, LLP

Michael N. Mercanti Registration No. 33,966

MUSERLIAN, LUCAS & MERCANTI, LLP

475 Park Avenue South

New York, New York 10016

Phone:

212-661-8000

Fax:

212-661-8002

"Express Mail" mailing label no. EV 403 032 312 US Date of Deposit February 27, 2004

Date of Deposit February 27, 2004
I hereby certify that this correspondence and/or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above, in an envelope addressed to: "Commissioner for Patents, P.O. Box 1450 Alexandria, VA 22313-1450"

MUSERLIAN, LUCAS & MERCANTI

By: Carta Santos





Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N. MI2003 A 000369



Si dichiara che l'unita copia en la me ai documenti originali

aepositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

3 0 OTT. 2003

Roma, lì.

L IL DIRIGENTE

Dr.ssa Paola Giuliano

UFFICIO ITALIAI	RO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO INO BREVETTI E MARCHI - ROMA EVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUB	MODULO 100
A. RICHIEDENTE (I)	VETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ARTIOIPALA ROCCOSISIENA LE POS	LE ZESTIMATE
nichiebente (i) 1) Denominazione	FARMAKA S.r.1.	Ste Ste
Residenza	GRANDATE (CO)	0.4.8.9.9.2.70 47.30
2) Denominazione		
Residenza	codice	
B. RAPPRESENTANTE	E DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.	
cognome nome	Luciano Aimi, Antonio Pizzoli et al. cod fiscale	
denominazione stud	dio di appartenenza SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.p.A.	
_{via} Cardu		cap [20,123 (prov) [M]
	IVO destinatario come sopra	
via L		cap (prov)
	classe proposta (sez/cl/scl) gruppo/sottogruppo L/ L IZIONE COSMETICA O FARMACEUTICA AD USO TOPICO FARE L'ALOPECIA ANDROGENETICA"	PER IMPEDIRE O
l		
E. INVENTORI DESIGN		ne nome
1) CITER	RNESI Ugo Raffaello 3)	
2)	4)	
F. PRIORITÀ	allegato	SCIOGLIMENTO RISERVE
nazione o orga	ganizzazione tipo di priorità numero di domanda data di deposito S/R	Data N° Protocollo
1) [
2)		///
C CENTRO ARII ITAT	TO NI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione	l
H. ANNOTAZIONI SPE	ECIALI STUCKOVICIEN MINISTERIO	A. C.
DOCUMENTAZIONE AL		SCIOGLIMENTO RISERVE
N. es.		C: Data N° Protocollo
. و ا	03	
1. —		
·		
0 =		confronta singole priorità
	RIS autorizzazione o atto di cessione	
Doc. 7) Q	nominativo completo del richiedente	h
,	euro	obbligatorio obbligatorio
	8/202/2003 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) LIL Mandatario	A OUTINGATORIO
	NO Dr.	uciano AIMI
		ecr. Albo 130 BM
venit Ailu		
CAMERA DI COMMER	RCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO MILANO	codice 1 5
VERBALE DI DEPOSITO	MT20024 000260	
L'anno duemila DU	VENTOTTO VENTOTTO	J. del mese di FEBBRALO
Carrie ducinila	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	concessione del brevetto soprariportato.
	RIE DELL'UFFICIALE ROGANTE	
L		
L		
¥/	IL DEPOSITANTE M. CORT	ONES I ROGANZE
iulla	MR MINUCIO CO	

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE NUMERO DOMANDA NUMERO BREVETTO REG. A	DATA DI RILASCIO
D. THOUS U'COMPOSIZIONE COSMETICA O FARMACEUTICA AD CONTRASTARE L'ALOPECIA ANDROGENETICA"	USO TOPICO PER IMPEDIRE O

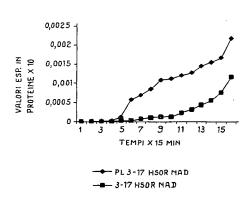
Una composizione cosmetico-farmaceutica ad uso topico contro l'alopecia umana comprende sostanzialmente un pool di enzimi della classe delle idrossisteroido-deidrogenasi specifiche in presenza del coenzima nicotinammido-adenin-dinucleotide e di un vasodilatatore, il tutto complessato con fosfolipidi in soluzione.

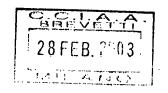
M. DISEGNO

L. RIASSUNTO



CURVE DI ASSORBIMENTO IN VITRO





DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"COMPOSIZIONE COSMETICA O FARMACEUTICA AD USO TOPICO PER IMPEDIRE O CONTRASTARE L'ALOPECIA ANDROGENETICA" a nome della società FARMAKA S.r.l., con sede a GRANDATE (CO)

La presente invenzione riguarda una composizione utilizzabile nel trattamento cosmetico-terapeutico preventivo e/o curativo dell'alopecia o in generale della perdita anomala dei capelli.

Più in particolare, la presente invenzione si riferisce ad una composizione enzimatica che permette di contrastare le cause che provocano la caduta dei capelli.

Come è noto, la perdita dei capelli è imputabile a varie cause, tra le quali la più accreditata è riconducibile all'azione di particolari enzimi che agiscono a livello degli ormoni sessuali favorendone la trasformazione in determinate direzioni. Così, per esempio nell'uomo il testosterone può essere convertito con facilità, in certe condizioni, in diidrotestosterone che è il principale responsabile dell'atrofia e morte dei bulbi piliferi. Questa reazione di riduzione può infatti essere catalizzata dalla 5-alfa-riduttasi che è presente nei testicoli e nella prostata.

D'altra parte, la generale capacità posseduta da certi enzimi di agire in senso ossidativo o riduttivo secondo le condizioni operative ha spinto i ricercatori a cercare combinazioni di enzimi ed altri tipi di sostanze per orientare nella direzione voluta la reazione interessata. Si veda per esempio a questo proposito US 5 756 092, JP 62 012 721 e WO 01/66702.

In particolare, l'ultimo documento citato, cioè la domanda di brevetto internazionale WO 0166702, riguarda l'uso di $3-\alpha$ -idrossisteroido-ossidoriduttasi ($3-\alpha$ -HSOR) e di un coenzima, nell'intento di ossidare il diidrotestosterone (DHT)

trasformandolo in una forma possibilmente neutra nei confronti dei bulbi piliferi.

Le sperimentazioni condotte dalla richiedente della presente domanda con lo stesso intento della suddetta domanda hanno tuttavia mostrato che l'abbinamento proposto delle 3- α -ossidoriduttasi con NADP(H)/NAD(H) non è sufficiente per ottenere l'effetto desiderato. La richiedente ha perfezionato gli studi ed ha trovato che una combinazione di 3- β -idrossisteroido-deidrogenasi (3- β -HSD) e/o 17- α -idrossisteroido-deidrogenasi (17- α -HSD) con peso molecolare di circa 100.000 D con nicotinammido-adenin-dinucleotide (NAD) in presenza di fosfolipidi raggiunge lo scopo voluto.

Scopo della presente invenzione è pertanto il proporre una composizione di idrossisteroido-deidrogenasi (HSD), nicotinammido-adenin-dinucleotide (NAD) e fosfolipidi in adatto veicolo acquoso per l'applicazione diretta sul cuoio capelluto. Poiché in presenza, ad esempio, di $3-\beta$ - e $17-\beta$ -HSD e di NAD, il testosterone si modifica in 4-androsteron-3,17-dione, il quale ultimo è presente nell'organismo soltanto come prodotto di escrezione (urine), si è cercato di ottenere delle HSD la cui azione ossidante fosse simile, si esplicasse non solo in vitro ma anche in vivo (cute) senza sbilanciare l'equilibrio ormonale interno, e che fossero ottenibili in modo relativamente semplice.

Sapendo inoltre che un singolo enzima non è generalmente sufficiente per catalizzare certe trasformazioni biochimiche, è stato individuato e sperimentato un pool enzimatico comprendente sostanzialmente 3- β -idrossisteroido-deidrogenasi (3- β -HSD) e 17- α -idrossisteroido-deidrogenasi (17- α -HSD), aventi peso molecolare di circa 100.000 Dalton ed estraibili da colture di microrganismi come lo Pseudomonas testosteroni.

Questo enzima, o meglio pool enzimatico, è stato individuato nella $3-\beta$ -

idrossisteroido-deidrogenasi (3- β -HSD) e nella 17- α -idrossisteroido-deidrogenasi (17- α -HSD), aventi peso molecolare pari a 100.000 ed estraibili da colture di microrganismi come lo Pseudomonas testosteroni.

Lo Pseudomonas testosteroni è stato coltivato in mezzo minimo contenente, come sola fonte energetica, lo 0,2% di diidrotestosterone (DHT) e, dopo adeguata selezione e purificazione attraverso successive colture liquide in ambiente microalofilo e incubazione a 37°C, si è proceduto ad un trattamento con ultrasuoni allo scopo di lisare le pareti cellulari e ottenere il brodo colturale. Questo è stato poi sottoposto ad ultrafiltrazione, impostando il cut-off del pool enzimatico risultante a 150.000 e a 100.000, in modo da escludere le 3-alfa-idrossisteroido-deidrogenasi, che hanno un peso molecolare di circa 47.000, e isolare invece le 3-beta- e 17-alfa-idrossisteroido-deidrogenasi con peso molecolare di circa 100.000 D. Il liquido ultrafiltrato è stato poi concentrato e liofilizzato, ottenendo una polvere igroscopica in cui i suddetti enzimi selezionati hanno una concentrazione non inferiore a 75%.

Alla polvere ad attività enzimatica così ottenuta è stato poi aggiunto NAD (nicotinammido-adenin-dinucleotide) commerciale e il tutto è stato sciolto in acqua e alcool al 20%, a cui è stata aggiunta una quantità di fosfolipidi di origine vegetale sufficiente a formare un impasto semisolido, miscelato intimamente in seguito in agitatore magnetico per 12 ore. All'impasto semiliquido è stata poi aggiunta acqua allo scopo di ottenere la formazione di liposomi e, dopo centrifugazione a 5000 giri al minuto (rpm) per 30 minuti, si è proceduto ad una concentrazione sotto vuoto per ottenere la totale eliminazione dei solventi e la formazione di una polvere, che sarà reidratata per dare complessi di liposomi e fosfolipidi. È essenziale sottolineare a questo proposito che il coenzima utilizzato era nicotinammido-adenin-dinucleotide non idrogenato (cioè NAD e non NAD(H))).

La soluzione attiva di 3- β - e 17- α -HSOR, NAD e fosfolipidi è stata saggiata in vitro per verificarne e determinarne l'assorbimento attraverso interibrane semipermeabili artificiali o di origine naturale. A questo scopo sono state usate celle termostatate in vetro di tipo Franz, seguendo un protocollo standard, in accordo con le indicazioni dell'UNIPRO (Cosmesi Dermatologica, anno 12, No. 61, Aprile-Giugno 1997, pag. 31-40) con lievi modifiche.

La figura 1 mostra schematicamente in sezione longitudinale il tipo di cella utilizzato con relativi accessori.

È stata utilizzata pelle fresca di suino ridotta ad 1 mm di spessore mediante dermoabrasione, asportando accuratamente la parte grassa e mantenendo inalterato lo strato corneo, l'epidermide e parte del derma. Con una fustellatrice si sono ottenute delle membrane circolari del diametro di 20 mm. controllate poi al microscopio per verificare l'assenza di irregolarità o lesioni, che sono state poste subito dopo in celle tipo Franz con il derma rivolto verso il liquido recettore (verso il basso) e lo strato corneo verso il liquido donatore (verso l'alto). La durata per ogni prova è stata di 24 ore. Ogni cella di vetro utilizzata, essenzialmente cilindrica, aveva un raggio di 20 mm con una superficie circolare di scambio pari a 12,56 cm² e conteneva un volume di liquido recettore di 22 ml. Il liquido recettore per le prove era costituito da acqua distillata sterile avente la seguente composizione salina: NaCl 0,14 M + K₂HPO₄ 2 mM + KH₂PO₄ 0,4 mM, con l'aggiunta di 100 UI di penicillina e 100 mg di streptomicina per ml. La termostatazione era ottenuta tramite la circolazione continua del liquido attraverso un sistema termostato/criostato della LKB a 33°±1°C. A intervalli di tempo regolari di 15 minuti veniva effettuato con una siringa un prelievo di 10 µl (10 mg) di liquido recettore, in modo da calcolare la quantità del complesso in esame passata attraverso la membrana di suino nel liquido recettore nell'unità di

tempo.

Il complesso enzimatico disciolto in acqua e sottoposto al saggio aveva la seguente composizione: 0.5% di $3-\beta$ -HSOR + $17-\alpha$ -HSOR; 0.5% di NAD e 99% di fosfolipidi. A fini di confronto, in un saggio parallelo, i fosfolipidi sono stati sostituiti con un'uguale quantità (99%) di veicolo inerte costituito da maltodestrine. Allo scopo di operare nelle stesse condizioni di pressione osmotica, sia il campione in prova, sia il riferimento sono stati sciolti in uguali quantità di liquido recettore fino ad una concentrazione scelta arbitrariamente e fissa del 10%. Dato che la quantità di ogni campione posta sulla membrana è stata per tutte le prove di 2 g, risulta che la quantità di enzima sottoposta al saggio era infine di 0.5g x 0.1 (= 10%) x 2g = 0.1g. Tale quantità è stata stabilita per via sperimentale con prove preliminari aventi lo scopo di ipotizzare per passi successivi la quantità di prodotto ritenuta necessaria per una valutazione dell'assorbimento tale da poter essere determinata analiticamente.

I dischetti di pelle sgrassata ottenuti come detto sopra mediante fustellatrice sono stati posti nelle celle di vetro tipo Franz con il derma in contatto con il liquido recettore e sopra lo strato corneo sono stati applicati i campioni da saggiare. Ad intervalli di tempo regolari di 15 minuti partendo dal tempo zero, erano poi effettuati prelievi di 10 microlitri di liquido recettore per calcolare la quantità di prodotto passata attraverso la membrana cutanea, dal liquido donatore al liquido recettore.

Si riportano a questo proposito in forma tabellare i risultati, espressi come percentuali di azoto riscontrate nel liquido recettore e derivanti da soluzioni di complessi di enzimi $3-\beta$ -HSOR + $17-\alpha$ -HSOR e NAD quale coenzima, in presenza e in assenza di fosfolipidi (PL).

···		
Tempo (minuti)	Con PL	Senza PL
1	0	0
2	0	0
3	1,81818 x 10 ⁻⁷	0
4	2,13904 " "	0
5 .	1,81818 x 10 -6	2,12157 x 10 ⁻⁷
6	9,56938 " "	2,17226 " "
7	1,15808 x 10 -5	$1,21212 \times 10^{-6}$
8	1,39860 " "	1,62338 " "
9	1,81818 " "	1,95503 " "
10	1,87441 " "	2,11416 " "
11	2,02020 " "	3,63636 " "
12	2,13904 " "	5,07872 " "
13	2,42424 " "	7,27273 " "
14	2,59740 " "	9,09091 " "
15	2,79720 " "	1,25392 x 10 -5
16	3,63636 " "	1,95503 " "

Questi risultati sono schematizzati graficamente in figura 2.

Al fine di determinare la presenza e il grado di attività deidrogenasica del complesso di enzimi utilizzato, è stato adottato il metodo al formazano, secondo il quale un composto incolore (sale di tetrazolio) si trasforma in composto colorato (formazano) solo in presenza di reazioni ossidative di deidrogenazione. Ora, le deidrogenasi, quali le HSOR, sono enzimi che catalizzano queste reazioni in substrati diversi, fra i quali anche nei mitocondri, per cui la conversione di tetrazolio a formazano può servire per valutare la produzione di energia e l'attivazione dei metabolismi cellulari da parte di cellule vive. La reazione di conversione è misurabile stechiometricamente dosando per via spettroscopica il formazano formatosi. Sfruttando questo principio, le cellule possono essere incubate con sostanze diverse allo scopo di determinarne l'attività e/o valutare il livello di tossicità delle sostanze usate. Nel nostro caso, infatti, l'effetto eventualmente inadeguato o dannoso di una sostanza inibirebbe l'attività delle deidrogenasi mitocondriali ed impedirebbe, quindi,

la conversione del tetrazolio in formazano. Mediante il dosaggio del formazano con uno spettrofotometro, si può per contro stabilire il livello di vitalità cellulare prima e dopo il trattamento con le deidrogenasi prescelte.

La metodica utilizzata nel caso della presente invenzione ha previsto: **A)** il controllo di base operato sui soli bulbi piliferi in mezzo colturale Williams; **B)** l'azione sui bulbi in mezzo Williams addizionato di 10 ng/ml di DHT; **C)** come in B) ma con l'aggiunta di 10 ng/ml di $3-\beta$ -HSOR + $17-\alpha$ -HSOR e altri 10 ng/ml di NAD idrogenato (NADH); e **D)** come in C) ma sostituendo il NADH con un'uguale quantità di NAD (non idrogenato). I risultati ottenuti sono riportati schematicamente in forma di istogramma tridimensionale nella figura 3.

Nel seguito si riportano esempi di formulazioni utilizzabili per applicazione topica secondo la presente invenzione, dove i valori sono percentuali in peso.

Esempio 1

Complesso fosfolipidico di enzima 3	$-\beta$ -17- α -HSOR e NAD.		
Alcool etilico a 70°	75		
Fosfolipidi di soia	24		
HSOR	0,5		
NAD	0,25		
Soluzione base			
Capsicina 1:200 in alcool 96 D	0,5		
Metilnicotinato	0,2		
Alcool etilico 96 D	20		
Carbitolo	7		
PEG-7/gliceril-cocoato DAB CG	2,5		
Acqua deionizzata	54,75		
Propilenglicol	14		
Aroma	1		
Metionina + Cisteina HCl + Ornitina HCl			
+ Biotina + Condroitinsolfato	ana 0,01		

Esempio 2

Il complesso comprende gli stessi costituenti dell'esempio 1 nelle seguenti percentuali:

Alcool etilico/Glicerina 40/60	75
Fosfolipidi di soia	24
HSOR	0,5
NAD .	0,25
Turfil-nicotinato	0,25

Soluzione base

BOIGETONE BUSE		
PEG 7/Glicerilcocoato		2,6
Carbitolo		7
Acido ialuronico		1
Pentilenglicol		3,5
Estratto di rosmarino		0,5
Estratto di tè verde		0,5
Acqua	q.b. a	100
		



Esempio3

Il complesso ha le stesse composizioni e percentuali dell'esempio 2.

Sol	uzi	on	е	<u>base</u>

PEG 7/Glicerilcocoato	2,6
Carbitolo	7
Acido ialuronico	1
Pentilenglicol	3,5
Rame cloruro	0,02
Potassio ioduro	0,1
Ferro cloruro (ico)	0,02
Zinco cloruro	0,05

Biotina + Metionina + Cisteina HCl + Ornitina HCl	ana	0,01
Acqua	q.b. a	100

RIVENDICAZIONI

- 1. Composizione per uso topico in campo cosmetico o farmaceutico,, caratterizzata dal fatto di comprendente un pool di enzimi, un coenzima ed un vasodilatatore complessati con fosfolipidi in soluzione.
- Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto che nel pool 2. enzimatico sono presenti in prevalenza 3-β-idrossisteroido-ossidoriduttasi (3-β-HSOR) e $17-\alpha$ -idrossisteroido-ossidoriduttasi ($17-\alpha$ -HSOR), entrambi con PM di circa 100.000 D, il coenzima è nicotinammido-adenin-dinucleotide (NAD) e il vasodilatatore è un derivato dell'acido nicotinico.
- Composizione secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzata dal fatto di 3. comprendere, oltre ai detti pool enzimatico, coenzima e vasodilatatore, anche ausiliari, additivi, farmaci e altri principi attivi.
- Impiego della composizione cosmetica o farmaceutica secondo una qualsiasi 4. delle precedenti rivendicazioni per il trattamento dell'alopecia umana.
- Impiego della composizione cosmetica o farmaceutica secondo una qualsiasi 5. delle rivendicazioni da 1 a 4 per il trattamento di inestetismi della cute e dei suoi annessi.

pp. FARMAKA S.r.l.

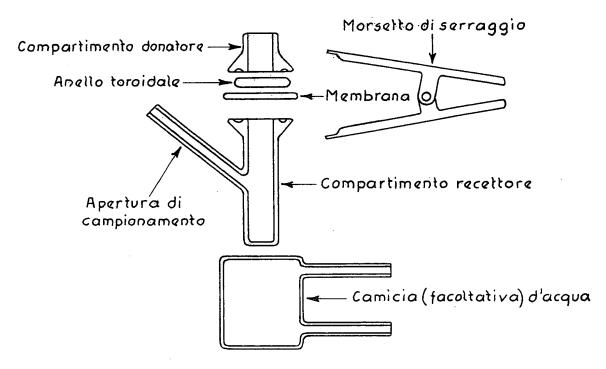
Il mandatario

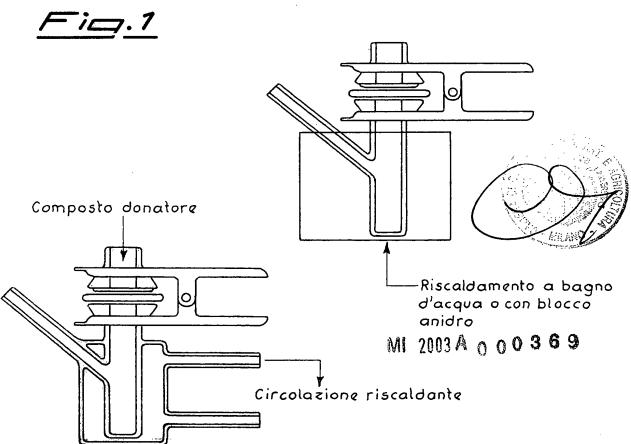
Nº iscr. Albo 130 BM

(Società Italiana Brevetti S.p.A.)

bi1383m/LA

Società Italiana Brevetti S.p.A. - Milano





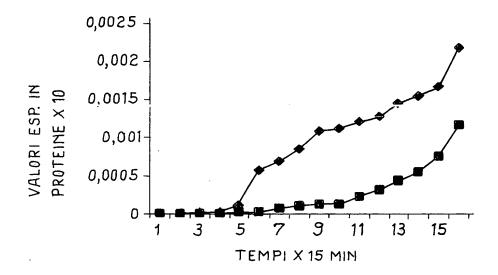
Il Mandatario:

Dr. Luciano AlMI

N° iscr. Albo 130 BM

Fig. 2

CURVE DI ASSORBIMENTO IN VITRO



PL 3-17 HSOR MAD

---- 3-17 HSOR NAD

MI 2003 A 0 0 0 3 6 9

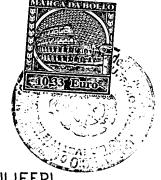


Il Mandatario:

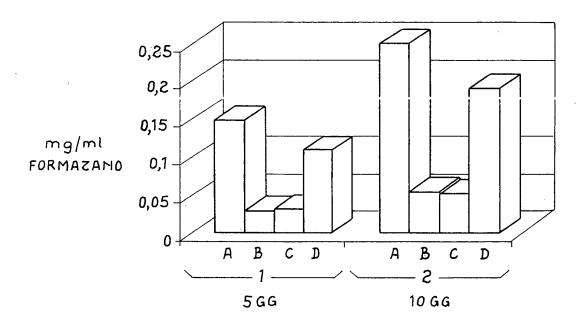
Dr. Luciano AIMI Nº iscr. Albo 130 BM

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI &BA





FORMAZANO PRODOTTO IN COLTURE DI BULBI PILIFERI DOPO 5 E 10 GIORNI DI INCUBAZIONE



MI 2003 A 0 0 0 3 6 9



Il Mandatario:

Lu Luciano Aliai no ison 1150 130 BM